

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

16.11.2004

REGD 13 JAN 2005

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2003年11月25日

出願番号
Application Number: 特願2003-394273

[ST. 10/C]: [JP2003-394273]

出願人
Applicant(s): 独立行政法人科学技術振興機構

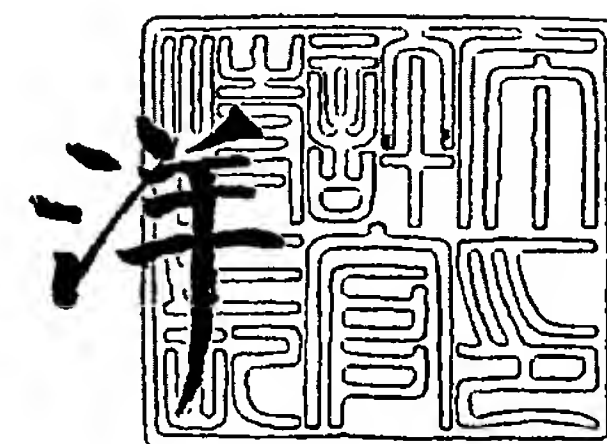
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1 (a) OR (b)

2004年12月24日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特2004-3117544

【書類名】 特許願
【整理番号】 PS03-1369
【あて先】 特許庁長官殿
【発明者】
 【住所又は居所】 愛知県岡崎市戸崎町藤狭 2 0 - 4
 【氏名】 堀内 嵩
【発明者】
 【住所又は居所】 愛知県岡崎市上地 6 - 3 4 - 9
 【氏名】 渡邊 孝明
【特許出願人】
 【識別番号】 503360115
 【氏名又は名称】 独立行政法人 科学技術振興機構
【代理人】
 【識別番号】 100110249
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 下田 昭
【選任した代理人】
 【識別番号】 100113022
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 赤尾 謙一郎
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 205203
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

A-B-C-D-C'-B'-A' (式中、AとA'は互いに相同的組換え可能な2本鎖DNAであって一方を他方に対して逆方向に配列させた2本鎖DNA断片、BとB'は互いに相同的組換え可能な遺伝子であって同一方向に配列した遺伝子をそれぞれ少なくとも一種含む増幅部分、CとC'は互いに相同的組換え可能な2本鎖DNAであって一方を他方に対して逆方向に配列させた2本鎖DNA断片、Dはエンドヌクレアーゼによる切断箇所を少なくとも一つ有する2本鎖DNA断片を表し、これらの間に任意のDNA配列が挿入されていてもよい。)の配列から成る2本鎖DNA。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の 2 本鎖 DNA を含む組換えベクター。

【請求項 3】

請求項 1 に記載の 2 本鎖 DNA が導入され形質転換された形質転換体。

【請求項 4】

前記 B 及び B' がそれぞれ増幅目的の遺伝子及び増幅選択のための遺伝子を含む請求項 1 に記載の 2 本鎖 DNA が導入された形質転換体を用意する段階、及びこれにエンドヌクレアーゼを作用させる段階から成る遺伝子増幅法。

【請求項 5】

請求項 4 に記載の方法により得られた細胞を培養することから成る、増幅した遺伝子がコードするタンパク質を製造する方法。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 遺伝子増幅法

【技術分野】

【0001】

この発明は、遺伝子を高速で増幅する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

遺伝子増幅を人為的に起こさせるために通常動物培養細胞を用いるが、(i) 時間が掛かる(半年～1年)、(ii) 増幅していないクローンも多い、(iii) 増幅機構が未解明で経験に頼っている、等の問題点がある。一方、酵母を用いた遺伝子増幅の系は無く、通常そのためにはプラスミドが用いられるが、一定以上のコピー数の増加は困難である。

本発明のシステムは、BIR(Break-Induced-Replication) と呼ばれる生物が有する能力に基礎をおいたものである(非特許文献1、2)。これは染色体が切断されると、その切られた染色体は自分と同じ配列を見つけ、その相同性を利用してそこに侵入し、複製点を構築し、複製を開始することで、自分を救済すると考えられる。生物はすべてこの能力を有すると考えられる。

【0003】

【非特許文献1】 PNAS, vol.98, no.15, 8255-8262 (July 17, 2001)

【非特許文献2】 Genes Dev 12, 3831-3842 (1998)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明は、高速で遺伝子を増幅するための2本鎖DNA及びこれを用いた遺伝子増幅法を提供する。この方法は、人為的に増幅系を完全に構築していること、同調して増幅出来ること、増幅期間が短い(恐らく1世代)こと、増幅機構が明らかなこと等の特徴を有している。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明者らは、生体内での遺伝子の複製の機構に基づいて、人為的に遺伝子増幅を高速に起こさせる系を構築した。まず増幅目的の遺伝子、増幅のために必要な領域、DNAの切断場所、を図1に示すように配置させ、これを染色体等に導入する。次に特異的な配列を切断する酵素の発現を誘導すると、特異的な部位に切断が起き、それが引き金となって遺伝子増幅が高速に起こる系を構築した。これを実際試したところ遺伝子増幅を確認した。

【0006】

即ち、本発明は、 $A-B-C-D-C'-B'-A'$ (式中、AとA'は互いに相同的組換え可能な2本鎖DNAであって一方を他方に対して逆方向に配列させた2本鎖DNA断片、BとB'は互いに相同的組換え可能な遺伝子であって同一方向に配列した遺伝子をそれぞれ少なくとも一種含む増幅部分、CとC'は互いに相同的組換え可能な2本鎖DNAであって一方を他方に対して逆方向に配列させた2本鎖DNA断片、Dはエンドヌクレアーゼによる切断箇所を少なくとも一つ有する2本鎖DNA断片を表し、これらの間に任意のDNA配列が挿入されていてもよい。)の配列から成る2本鎖DNAである。

また、本発明は、この2本鎖DNAを含む組換えベクターであり、この2本鎖DNAが導入され形質転換された形質転換体である。このベクターは、この遺伝子以外に、プロモーターやエンハンサー等の転写開始シグナル、更にターミネーター配列を有してもよい。

更に、本発明は、前記B及びB'がそれぞれ増幅目的の遺伝子及び増幅選択のための遺伝子を含む請求項1に記載の2本鎖DNAが導入された形質転換体を用意する段階、及びこれにエンドヌクレアーゼを作用させる段階から成る遺伝子増幅法であり、更にこの方法により得られた細胞を培養することから成る、増幅した遺伝子がコードするタンパク質を製造する方法である。

【発明の効果】

【0007】

本発明の方法により、少なくとも数十コピーに増加したクローンを得ることが出来た。その中にはおそらく百コピー以上増幅したものがあると考えられる。増幅の場として、通常の染色体を用いて調べたが（実施例2）、高度な増幅を達成できた。

【発明を実施するための最良の形態】

【0008】

本発明の、遺伝子増幅用の2本鎖DNAはA-B-C-D-C'-B'-A'の配列から成る（図1参照）。

このAとA'は互いに相長的組換え可能な2本鎖DNA、好ましくは同一配列の2本鎖DNAである。AとA'は相同性が90%以上であることが好ましい。更に、AとA'のうち特に切断部分（D）に近い部分（例えば、10~30bp）の相同性が高いことがより好ましい。また、AとA'はその長さが500bp以上であることが好ましい。短いと、増幅の結果副産物が多く生成したり、意図しない箇所に相長的組換えが起こる可能性がある。

またAとA'とは、図1に示すように一方を他方に対して逆方向に配列させる。

CとC'はAとA'と同様の関係にある。

【0009】

BとB'は増幅部分であり、それぞれ一種の遺伝子のみを含んでもよいが、複数の遺伝子を含んでもよい。BとB'に含まれる遺伝子のうち少なくとも一種は、互いに相長的組換え可能であること、好ましくは同一の遺伝子であることを要する。更に、この部分は、後述のleu2dのような増幅選択遺伝子を少なくとも一つ含むことが好ましい。

【0010】

Dはエンドヌクレアーゼによる切断箇所を少なくとも一つ有する。Dは切断箇所を2ヶ所有し、その間にマーカーとなりうる遺伝子を含むことが好ましい。この遺伝子は、例えば、実施例で用いた栄養要求性選択遺伝子（URA3遺伝子）の如きものであって、これを利用して増幅単位が維持されている細胞を選択することができる。

エンドヌクレアーゼは、通常の5bp程度の配列を認識して切断する酵素よりも、より長い配列を認識して切断するH₂OエンドヌクレアーゼやI-SceI酵素などが好ましい。

【0011】

また本発明の2本鎖DNAにおいて、増幅の効率の観点からA~C間とA'~C'間とがほぼ同じ長さであることが好ましい。そのため又は他の理由から、上記各要素の間に任意のDNA配列が挿入されていてもよい。

【0012】

遺伝子を増幅させるためには、上記のように構成された2本鎖DNAを実際遺伝子増幅の起る微生物、細胞又は動物個体等に導入する。この宿主として、大腸菌や枯草菌等の細菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞、植物細胞及び哺乳動物固体等が挙げられるが、特に酵母や動物細胞が好ましい。本発明の2本鎖DNA及び、必要に応じてプロモーターやエンハンサー等の転写開始シグナル、更にターミネーター配列を組み込んだプラスミドにより、通常の遺伝子工学的手法に従って、この宿主細胞を形質転換すればよい。

これにエンドヌクレアーゼを導入すると、切断箇所（D）において2本鎖DNAが切断され、図2に示すように、露出した相同配列同士（AとA'、CとC'）が対合することにより、同時に2ヶ所でBIRと呼ばれる反応が起こり、複製フォークが2ヶ所ある環（ローリングサークル）が形成され、遺伝子の複製が起こる。エンドヌクレアーゼを作用させるためには、この酵素を直接細胞に導入してもよいし、この酵素をコードする遺伝子を細胞内で発現させてもよい。

この反応の終了段階においては、それぞれ2ヶ所で増幅された遺伝子（BとB'）が組換えを起こして、上記サークルが除去され、増幅された遺伝子を含む2本鎖DNAが得られると考えられる。従って、BとB'とが逆向きの場合や、いずれか一方を含まない場合には、このようなサークルを切断除去する終了反応が起きないと考えられる。

また、この細胞を培養し、その培地若しくはその上清から、又はこれらを精製すること

により、目的の増幅遺伝子がコードするタンパク質を大量に製造することができる。

以下、実施例にて本発明を例証するが本発明を限定することを意図するものではない。

【実施例 1】

【0013】

図 2 上部に示すように、2 個の H0 配列 (配列番号 1) に挟まれた URA3 遺伝子 (配列番号 2)、2 種類の出芽酵母ゲノム相同配列 (YF257394-YF258454 (配列番号 3) 及び YF267165-YF268121 (配列番号 4), GeneBank Accession ID; NC 001138)、増幅選択マーカー遺伝子 leu2d (配列番号 5) が配置された増幅単位を構築した。

増幅選択マーカー遺伝子 leu2d は、ロイシンを合成する一群の酵素の一つで、この遺伝子が欠損すると、ロイシンを含まない培地では生育できない。用いた leu2d 欠損遺伝子は、プロモーター配列の大部分を欠くため発現量が非常に低いがごく弱い酵素活性を有しており、そのためこの遺伝子 1 個では、ロイシン抜き培地で生育不能だが、増幅すると、弱い活性が集まって十分な活性になり、ロイシン抜き培地で生育することができるようになる。この性質を増幅した菌の選択に用いた。

URA3 遺伝子は、leu2d 間の相同組換えによって欠失されてしまわずに増幅単位が維持されている細胞を選択するために用いられている。

この増幅単位内の H0 配列に二本鎖 DNA 切断が誘導され、露出したゲノム相同配列の末端がゲノム上の配列と対合することで新しい複製フォークが形成される。この BIR 反応が、図 2 中央のように 2 ヶ所で起こり、ローリングサークルタイプの複製が進行すると考えられる。サークル内の領域は 1 回のセルサイクルに爆発的に増幅され、増幅産物が細胞内で維持されると考えられる。

【実施例 2】

【0014】

実施例 1 で構築した増幅単位を、H0 エンドヌクレアーゼ遺伝子が GAL プロモーター下流に挿入された構造を染色体上に有する出芽酵母細胞株 (LS20) に導入した。マーカー遺伝子 leu2d 間の相同組換えによって欠失されてしまわずに、増幅単位が維持されている Ura⁺コロニーを単離し、ロイシンを欠くガラクトース培地上に塗布して H0 エンドヌクレアーゼの発現を誘導した。出現した Leu⁺コロニーの細胞を培養し、低融点アガロース内で染色体 DNA を調整した。

この染色体 DNA を PFGE (Pulsed-field gel electrophoresis) あるいは FIGE (Field-inversion gel electrophoresis) によって分離し、また制限酵素 XhoI によって消化された DNA をアガロースゲル電気泳動によって分離して、サザンブロット法にて解析した。

【0015】

ウラシルを欠くグルコース寒天培地で培養されたクローン (SD-Ura、H0 エンドヌクレアーゼ発現非誘導) 及びロイシンを欠くガラクトース寒天培地で培養されたクローン (SG-Leu、H0 エンドヌクレアーゼ発現誘導) について、プローブとして leu2d を用いて、PFGE によって分離された染色体 DNA 及びアガロースゲル電気泳動によって分離された XhoI 消化後の DNA を解析した。その結果を図 3 に示す。A は染色体 DNA を PFGE にて分離したもの、B は XhoI 消化後の DNA をアガロースゲル電気泳動にて分離したものを示す。

また、サザンブロット法による増幅産物の構造解析を図 4 に示す。A は PFGE で分離された染色体 DNA を RET2 プローブを用いて解析したもの、B は FIGE で分離された染色体 DNA を leu2d プローブを用いて解析したものを示す。

【0016】

その解析結果 (図 3) より、leu2d 断片を用いて第 3 染色体が一部改変されている宿主細胞株 LS20 においては、約 345 kb の第 3 染色体と 8.9 及び約 12.5 kb の XhoI 断片が検出された。一方、H0 エンドヌクレアーゼ発現を誘導していない陰性対照 [図 3 の 3, 4 レーン] では増幅単位が挿入された 292 kb の第 6 染色体とそれに由来する 11.6 kb の XhoI 断片が検出された。

これに対して、H0 エンドヌクレアーゼ発現が誘導されたコロニーに由来する細胞株にお

いては、これらと異なるサイズに強いシグナルが見られた。これらの細胞株はそのシグナルのパターンにより、4群に大別できることが分かった。第1群[35, 43, 44, 47, 54, 58, 63]は増幅過程の仮説から予測される通りのパターンを示し、そのサイズから第6染色体は5あるいは7個のleu2dを有していると思われる。第2群[45, 49, 56, 57, 66, 70, 72]ではPFGE解析において非常に強いシグナルが大きな分子サイズの領域に検出され、予想とは異なるXhoI断片が検出された。その後の解析により、これらは予測された配列とそれが一部転位した配列からなる高度な反復配列を有していることが示唆され、少なくとも数十コピー以上のleu2dを保持していると考えられる。

【0017】

また、増幅単位の挿入位置のセントロメア側に位置するRET2プロンプを用いた解析より、これらは染色体上で増幅していると考えられる(図4A)。

第3群[36, 38, 42, 46, 48, 50, 51, 53, 55, 59-62, 64, 65, 67-69]は、増幅単位を含む第6染色体のサイズに変動は無いが、XhoI断片のパターンには変化が見られた。FIGE解析の結果、この群に約23.5 kbの分子が検出された(図4B)。

その後の解析により、この分子は増幅単位の挿入位置のテロメア側の配列がパリンドローム様構造をとったミニ染色体として存在していることが判明した。上記以外の細胞株を含む第4群はleu2dの増幅を伴わない再編成の結果により生じたものであると推察される。

以上のように、ゲノム上での遺伝子増幅系において、第2群に見られたような想定した高度の増幅反応が観察された。

【0018】

比較例 1

図5に示すように、2種類の出芽酵母ゲノム相同配列を互いに順方向になるよう配列させ、実施例1と同様な増幅単位を構築した。

この増幅単位を用いて実施例2と同様の操作を行った。

この比較例1と実施例2で生成したコロニー及びその細胞数を、図6と図7に示す。

【産業上の利用可能性】

【0019】

本発明の2本鎖DNA又はこの2本鎖DNAが導入された細胞を用いることにより、極めて効率よく、短期間で遺伝子増幅を達成できる。また、この細胞を用いて有用タンパク質の大量生産が出来るため、タンパク製剤や人工抗体の生産に有用である。また、細胞を用いて、ある遺伝子の発現を大量に、長期間安定に保つことが出来るため、遺伝子治療に有用である。更に、遺伝子増幅と変異誘導を共役させることで、希望通りの機能を有した遺伝子を創造できる。

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】本発明の2本鎖DNAの構成を示す図である。

【図2】本発明の遺伝子増幅の様子を示す図である。CENはセントロメア、TELはテロメアを示す。DSB(Double Strand Break)は2本鎖切断末端を示す。

【図3】サザンブロット法による増幅産物の構造解析を示す図である。AはPFGEにより分離したもの、BはXhoI消化後のものを示す。パネルAの上の数字はクローン番号を示す。

【図4】サザンブロット法による増幅産物の構造解析を示す図である。AはPFGEで分離後、RET2プロンプで検出したもの、Bは同様にleu2dプロンプで検出したものを示す。

【図5】比較例1で用いた増幅単位を示す図である。

【図6】比較例1と実施例2で生成した細胞数を示す図である。

【図7】比較例1と実施例2で生成したコロニーの写真を示す図である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Agency

<120> 遺伝子増幅法

<130> PS03-1369

<160> 5

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 52

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 1

gcagcacgga atatgggact acttcgcgca acagtataat ttataaacc ct 52

<210> 2

<211> 1106

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 2

tttcaattca attcatcatt ttttttttat tctttttttt gatttcggtt tctttgaaat 60

ttttttgatt cggtaatctc cgaacagaag gaagaacgaa ggaaggagca cagacttaga 120

ttggtatata tacgcatatg tagtggtgaa gaaacatgaa attgcccagt attcttaacc 180

caactgcaca gaacaaaaac ctgcaggaaa cgaagataaa tcatgtcgaa agctacatat 240

aaggaacgtg ctgctactca tcctagtcct gttgctgcca agctatittaa tatcatgcac 300

gaaaagcaaa caaacttggtg tgcttcattg gatgttcgta ccaccaagga attactggag 360

ttagttgaag cattaggtcc caaaatttgt ttactaaaaa cacatgtgga tatcttgact 420

gatttttcca tggagggcac agttaagccg ctaaaggcat tatccgcaa gtacaatttt 480

ttactcttcg aagacagaaa atttgctgac attggtaata cagtcaaatt gcagtactct 540

gcgggtgtat acagaatagc agaatgggca gacattacga atgcacacgg tgtggtgggc 600

ccaggtattg ttagcggttt gaagcaggcg gcagaagaag taacaaagga acctagaggc 660

cttttgatgt tagcagaatt gtcatgcaag ggctccctat ctactggaga atatactaag 720
ggtactgttg acattgcgaa gagcgacaaa gattttgtta tcggctttat tgctcaaaga 780
gacatgggtg gaagagatga aggttacgat tggttgatta tgacacccgg tgtgggttta 840
gatgacaagg gagacgcatt ggggtcaacag tatagaaccg tggatgatgt ggtctctaca 900
ggatctgaca ttattattgt tggaagagga ctatttgcaa agggaaggga tgctaaggta 960
gagggtgaac gttacagaaa agcaggctgg gaagcatatt tgagaagatg cggccagcaa 1020
aactaaaaaa ctgtattata agtaaagtca tgtatactaa actcacaat tagagcttca 1080
atttaattat atcagttatt acccgg 1106

<210> 3
<211> 1061
<212> DNA
<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 3
taagtactca agaatgggcc agaaataatg ttagagttta taggggtgac agcccttgag 60
ctaataaata ctacaataac agtgtccgtt tgaatgctgg tcggtgaatc aatcaaagat 120
ttggttgcaa tgatatgtgc aattttgctg atggagcttg ctaaagttgt gatattagtc 180
gagatccaat tagaacggat taggcgggaa tcgcttgagg gatcgccaaa aatacttgtg 240
atttgtgtaa gttggttgta atgcaaacct gctatcttta ctttcgaaca aaatagatga 300
atcagcggct aagtattctg tggctaattg gctagataca tgttgagtac tgctatttgt 360
gcgcaaccgt tctaacaatg ctgagagatg atgaattgaa tatatcagaa gttttactag 420
ctacagtagt tgaggtacca atagtggggg tatgcaaaa ttactaaaa gcactgactg 480
gagttgtggt actagtgaat acctggtcca aataggttat gaaggaatca tttgagaatt 540
ggctagaagc aactaaaacg cccgtggatt gaggttcaga tttgctactg tcgctttcga 600
agaagctaga tgaaccacgg gtaaagtatt ctgcatctaa tgtgttcaat aaatattgag 660
tgacgttatc gtaatgttac agtactaaca ccgctagaaa atgctggtgt gaatgtgaat 720
gacgatagac ggactgatgc acttttccat tgtacgataa cattacttac aagattggga 780
gaagcatgat tgaaaatttg actggaagaa ccacttatat taggagtggc ggtattagta 840

gaaaattgac taaacgcac cgaaaattaa atagaattta aagtttcctt gggtgcactg 900
ttttgggctg cagtgcataa atccagaagt gttggagtca ggttacttgt ttgcatacag 960
acattactga agttttcaga aggcctttga atcgagaacg agataaggaa gtgtcctcta 1020
aatgcaattt tagagctcaa agtgaggata gtggcactga a 1061

<210> 4

<211> 957

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 4

ctagcatcaa agacgggtgt tggaatttga caatttgctt caatgtatcc aaggaagttt 60
taggtaatgg caggctaaat ctccaatca aacagcaaaa tacacctcaa gacgccccaa 120
gaattttgaa tgaaggcgag ctgaatcccg aactttgttc tttaatgtac aatttaatac 180
caaatgatt atccaacttg attagcttcg atgactcata cagatccata ccaatatcaa 240
cttcacggat aactttttca actcttttaa attcttcaac atcatttttc gatcaaactg 300
cgtcaggttt tacatataga tcaagcgttg tcggtttata ctacgatgtc atttacgatc 360
tgctgccaac agaagaaaca ttacgcagta ccttggaana atctaggcaa tttatagaca 420
tgaatctcct atcgttctta aaacaatgta tttcctgtcg ttgtctcgat tctctttttt 480
gctattctga aggacaggtc catttatcat ccagaattct aatcccgaat ttaagatata 540
gtaacagtaa caacatcata tccaagcacc gaagattcat tgctctatat tccttgtctt 600
cgaataagga agataccgag aagagactct ttaggagtcg ggcttgactc cctgccaag 660
cagctattcc tgtataacac gcgatatatt atctccttgt cgatcatgtga aagtcaaaca 720
gcgcacgttt gtttgatgaa gcagcaactc tcctcttact gcttttgcag aattttgtga 780
gaagctctct tctcttggaa ctaacctagc catatggctt tctgccctct ttccgtcaac 840
attacaagat aaagatatcg gtataattta aagattcgac ctttacgccc tacatggcta 900
aaattacaat gccaaaatta tcatgaattc actttgttga cccggaatta caataca 957

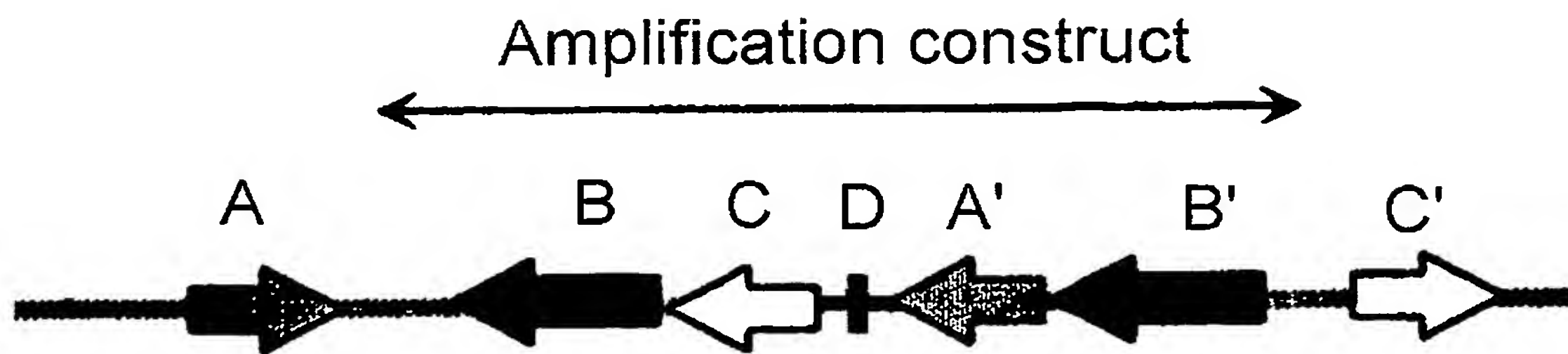
<210> 5

<211> 1953
<212> DNA
<213> *Saccharomyces cerevisiae*

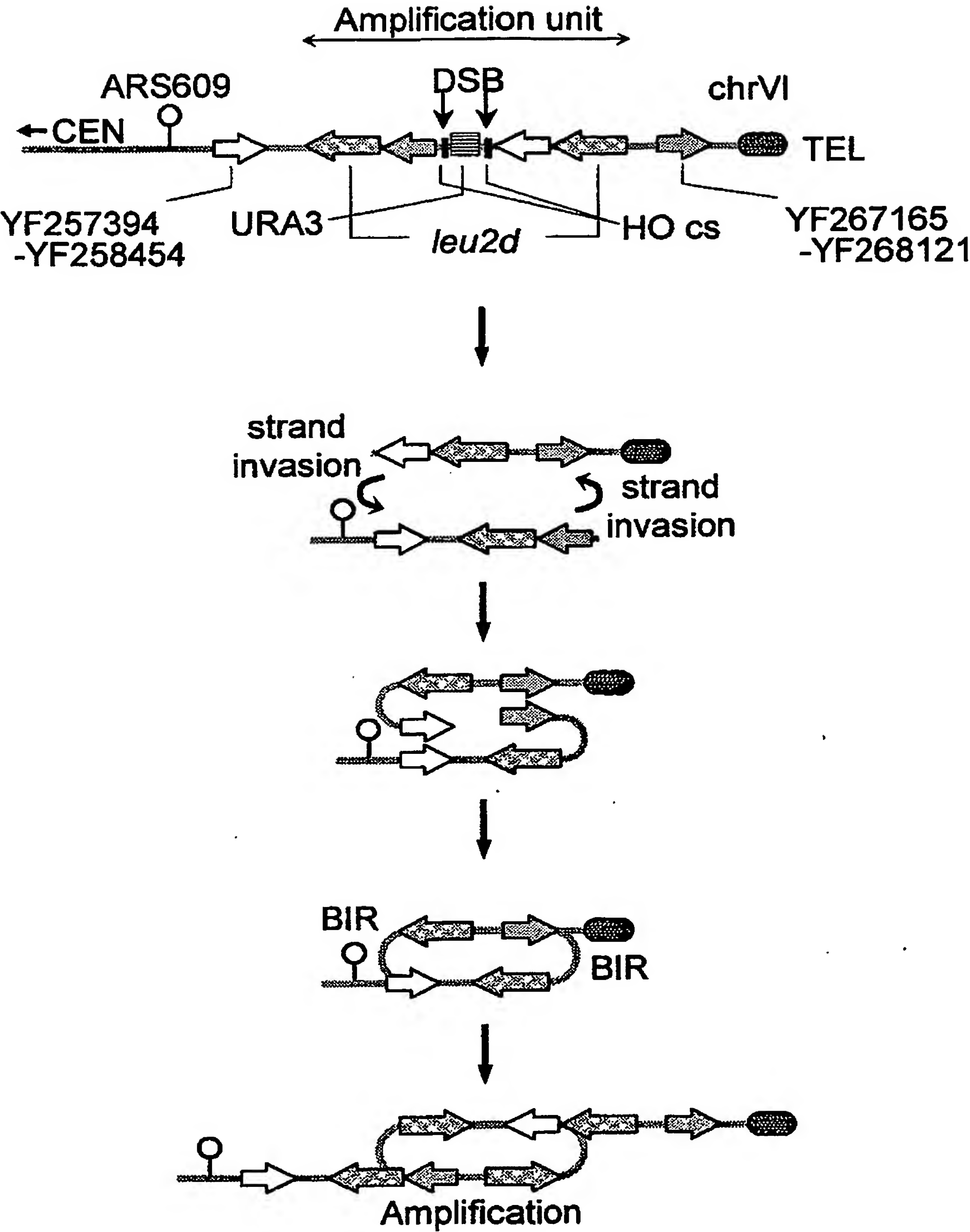
<400> 5
gatctagagg ttaactaagc gaatttctta tgatttatga tttttattat taaataagtt 60
ataaaaaaaaa taagtgtata caaatTTTaa agtgactctt aggtttttaa acgaaaattc 120
ttattcttga gtaactcttt cctgtaggtc aggttgcttt ctCaggtata gcatgaggtc 180
gtctttattg accacatctc taccggcatg ccgagcaaat gcctgcaaat cgctcccat 240
ttcacccaat ttagatatg ctaactccag caatgagttg atgaatctcg gtgtgtattt 300
tatgtcctca gaggacaaca cctgttgtaa tcgttcttcc acacggatct tatatatatt 360
tcaaggatat accattctaa tgtctgcccc taagaagatc gtcgttttgc caggtgacca 420
cgttgggtcaa gaaatcacag ccgaagccat taaggttctt aaagctatTT ctgatgttcg 480
ttccaatgtc aagttcgatt tcgaaaatca tTTaattggT ggtgctgcta tcgatgctac 540
aggtgtccca cttccagatg aggcgctgga agcctccaag aaggttgatg ccgttttgtt 600
aggtgctgtg ggtggtccta aatgggggtac cggtagtgtt agacctgaac aaggtttact 660
aaaaatccgt aaagaacttc aattgtacgc caacttaaga ccatgtaact ttgcatccga 720
ctctctttta gacttatctc caatcaagcc acaatttgct aaaggtactg acttcgttgt 780
tgtcagagaa ttagtgggag gtatttactt tggtaagaga aaggaagacg atggtgatgg 840
tgtcgcttgg gatagtgaac aatacaccgt tccagaagtg caaagaatca caagaatggc 900
cgctttcatg gccctacaac atgagccacc attgcctatt tggtccttgg ataaagctaa 960
tgttttggcc tcttcaagat tatggagaaa aactgtggag gaaaccatca agaacgaatt 1020
ccctacattg aaggttcaac atcaattgat tgattctgcc gccatgatcc tagttaagaa 1080
cccaaccac ctaaattggtt ttataatcac cagcaacatg tttggtgata tcatctccga 1140
tgaagcctcc gttatcccag gttccttggg tttgttgcca tctgcgtcct tggcctcttt 1200
gccagacaag aacaccgcat ttggtttgta cgaaccatgc cacggttctg ctccagattt 1260
gccaaagaat aaggtcaacc ctatcgccac tatcttgtct gctgcaatga tgttgaaatt 1320
gtcattgaac ttgcctgaag aaggtaaggc cattgaagat gcagttaaaa aggttttgga 1380

tgcaggtatc agaactggtg atttaggtgg ttccaacagt accacggaag tcggtgatgc 1440
tgtcgccgaa gaagttaaga aaatccttgc ttaaaaagat tctctttttt tatgatattt 1500
gtacataaac ttataaatg aaattcataa tagaaacgac acgaaattac aaaatggaat 1560
atgttcatag ggtagacgaa actatatacg caatctacat acatttatca agaaggagaa 1620
aaaggaggat gtaaaggaat acaggtaagc aaattgatac taatggctca acgtgataag 1680
gaaaaagaat tgcactttaa cattaatatt gacaaggagg agggcaccac acaaaaagtt 1740
aggtgtaaca gaaaatcatg aaactatgat tcctaattta tatattggag gattttctct 1800
aaaaaaaaaa aaatacaaca aataaaaaac actcaatgac ctgaccattt gatggagttt 1860
aagtcaatac cttcttgaac catttcccat aatggtgaaa gttccctcaa gaattttact 1920
ctgtcagaaa cggccttaac gacgtagtcg acg 1953

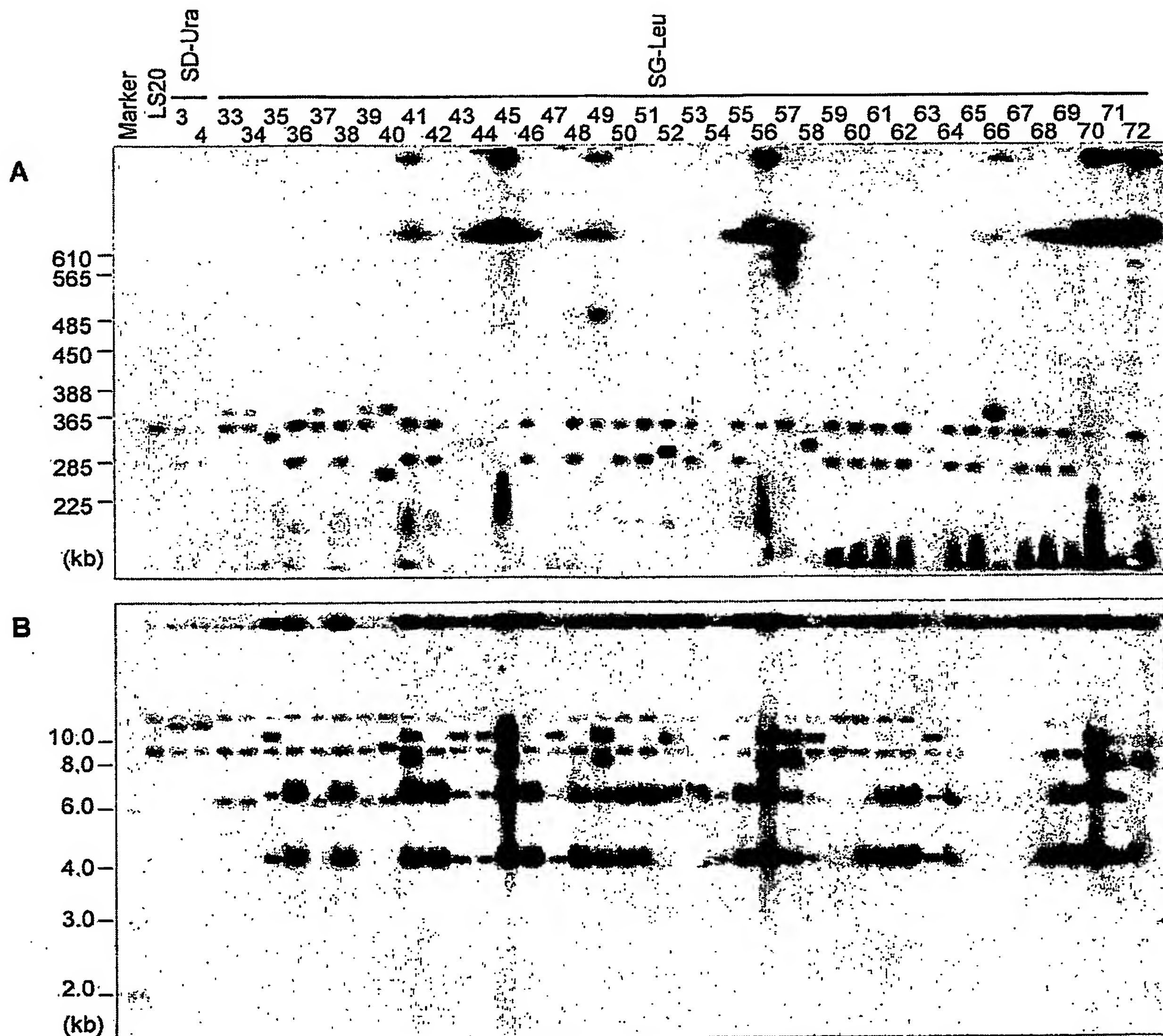
【書類名】 図面
【図 1】



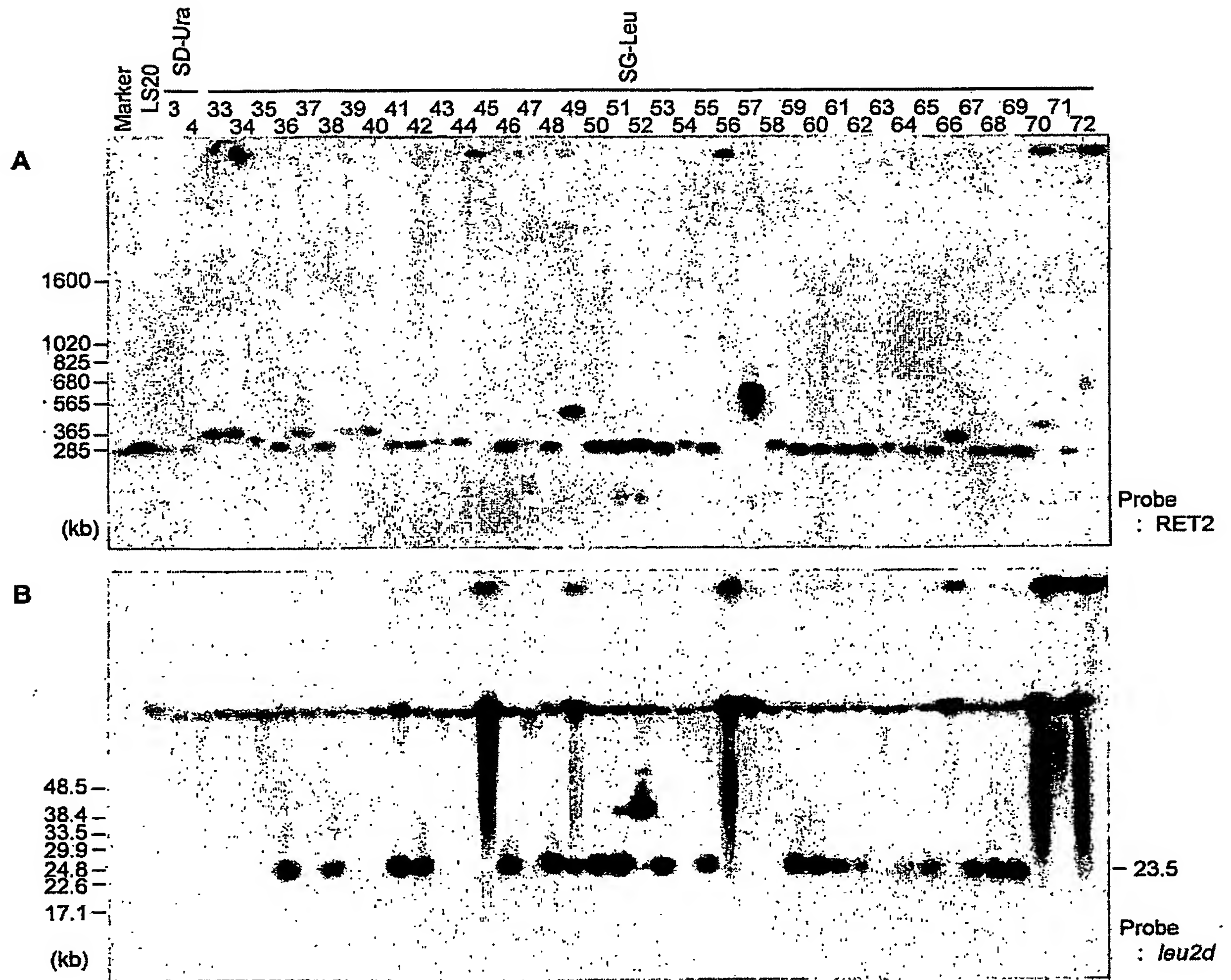
【図 2】



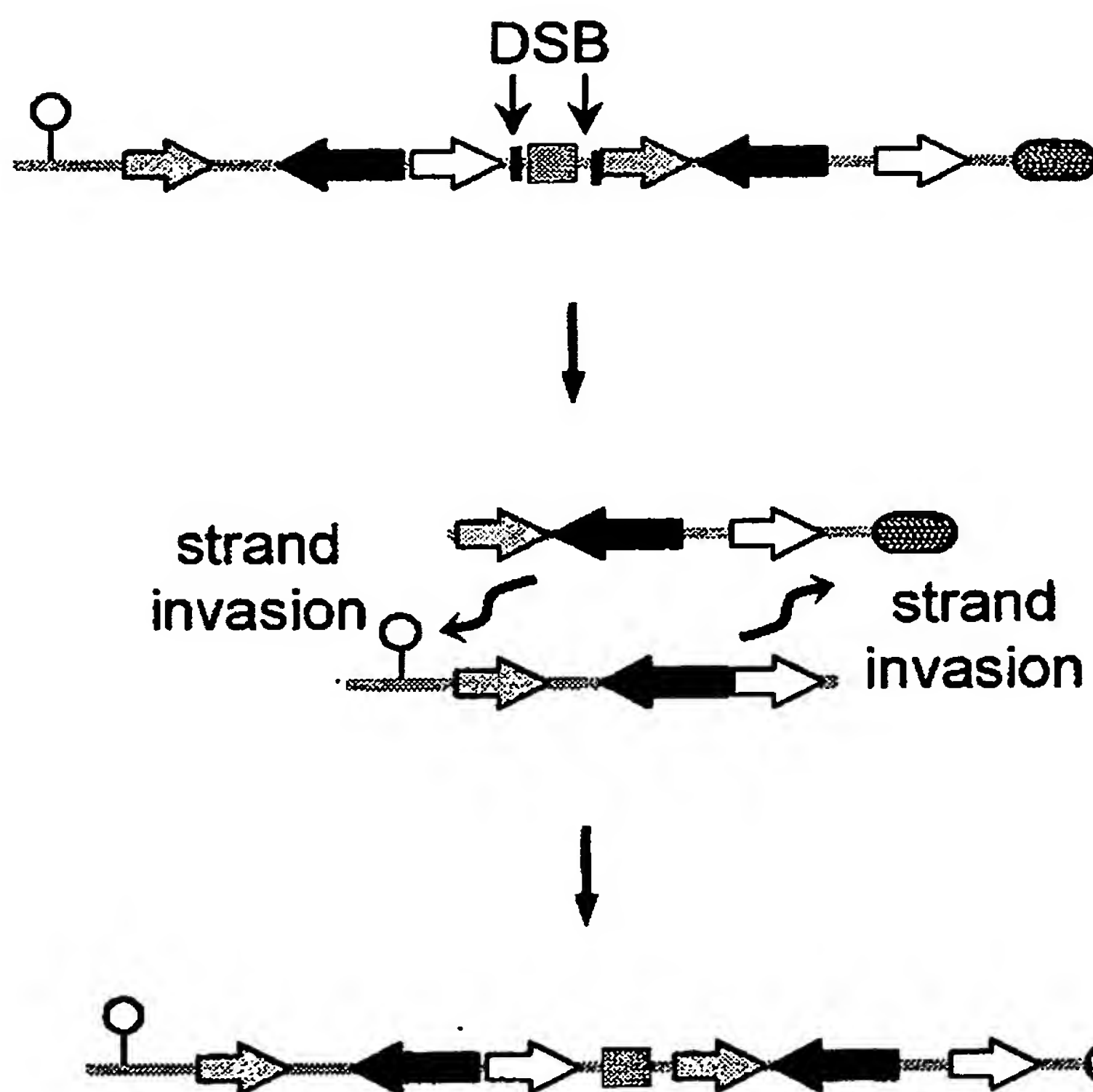
【図 3】



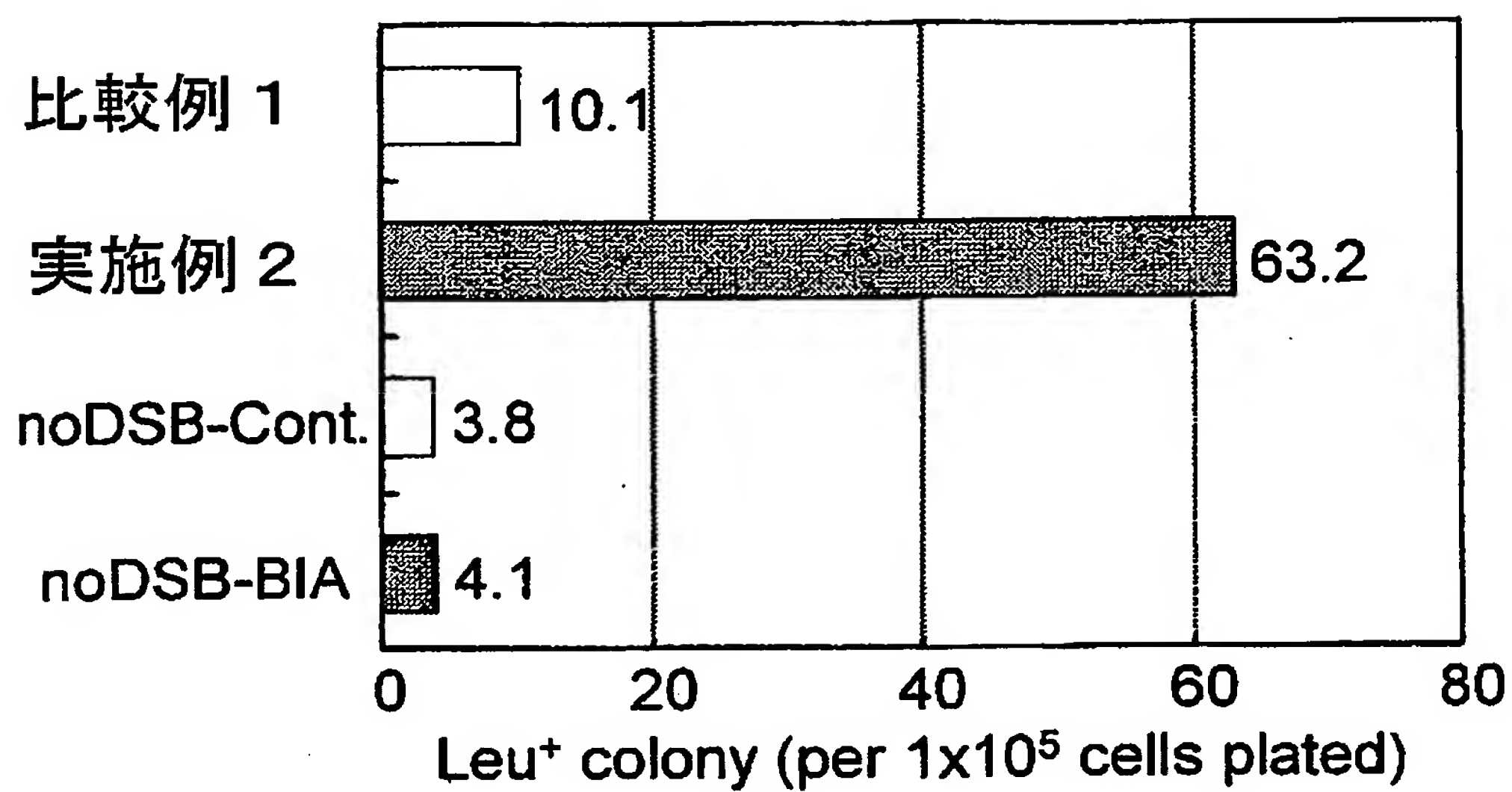
【図4】



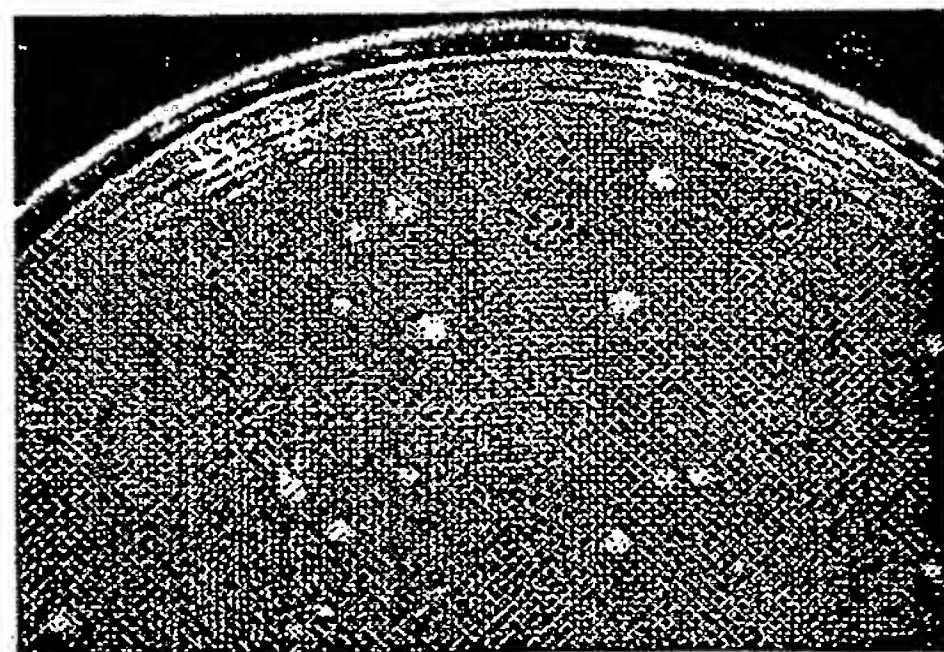
【図 5】



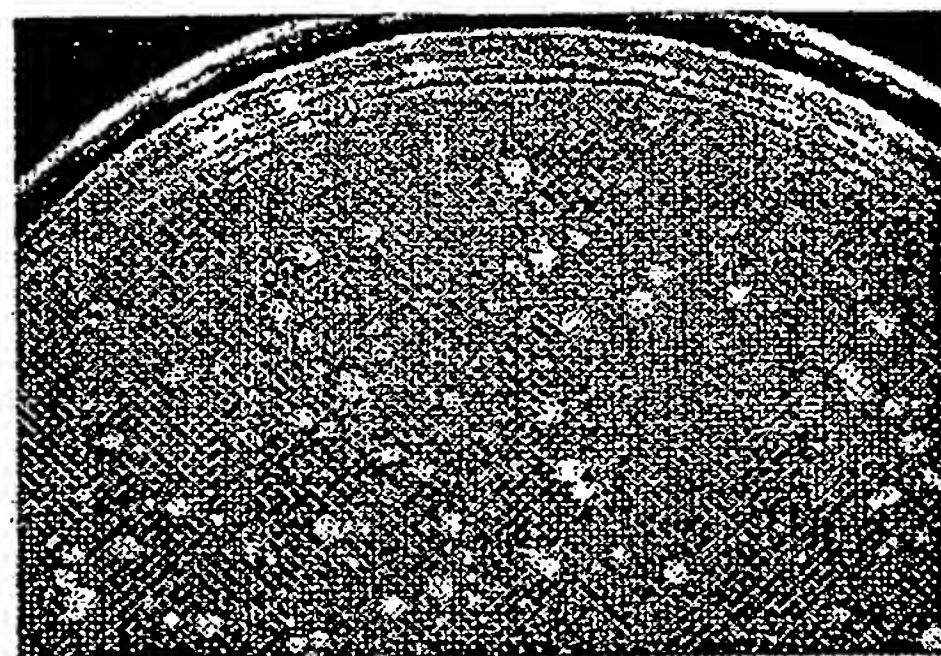
【図 6】



【図 7】



比較例 1



実施例 2

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 高速で遺伝子を増幅するための 2 本鎖 DNA 及びこれを用いた遺伝子増幅法を提供する。

【解決手段】 生体内での遺伝子の複製の機構に基づいて、人為的に遺伝子増幅を高速に起こさせる系を構築した。増幅目的の遺伝子、増幅のために必要な領域、DNA の切断場所配列から成る 2 本鎖 DNA (A-B-C-D-C'-B'-A' (図 1)、A と A' は互いに相同的組換え可能な 2 本鎖 DNA であって一方を他方に対して逆方向に配列させた 2 本鎖 DNA 断片、B と B' は互いに相同的組換え可能な遺伝子であって同一方向に配列した遺伝子をそれぞれ少なくとも一種含む増幅部分、C と C' は互いに相同的組換え可能な 2 本鎖 DNA であって一方を他方に対して逆方向に配列させた 2 本鎖 DNA 断片、D はエンドヌクレアーゼによる切断箇所を少なくとも一つ有する 2 本鎖 DNA 断片を表す) を染色体等に導入し、特異的な配列を切断する酵素の発現を誘導すると、特異的な部位に切断が起き、それが引き金となって遺伝子増幅が高速に起こる。

【選択図】 図 1

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 3 - 3 9 4 2 7 3
受付番号	5 0 3 0 1 9 3 7 9 9 8
書類名	特許願
担当官	第一担当上席 0 0 9 0
作成日	平成 1 5 年 1 1 月 2 6 日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成15年11月25日
-------	-------------

特願 2 0 0 3 - 3 9 4 2 7 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 0 3 3 6 0 1 1 5]

- | | |
|----------|-----------------------|
| 1. 変更年月日 | 2 0 0 3 年 1 0 月 1 日 |
| [変更理由] | 新規登録 |
| 住 所 | 埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号 |
| 氏 名 | 独立行政法人 科学技術振興機構 |
| | |
| 2. 変更年月日 | 2 0 0 4 年 4 月 1 日 |
| [変更理由] | 名称変更 |
| 住 所 | 埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号 |
| 氏 名 | 独立行政法人科学技術振興機構 |

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.